F A C U L T E D E M E D E C I N E D E P A R I S

696

Année 1966 T H E S E N°

pour le

D O C T O R A T en M E D E C I N E

Diplôme d'Etat

par

S A U G E R Françoise, Renée

née le 31 Mai 1938, à VERSAILLES

Attachée de Recherche à l' I . N . S . E . R . M .

Présentée et soutenue publiquement le

CONTRIBUTION A L'ETUDE d'UNE DESOXYRIBONUCLEASE de T Y P E I I

Président : Monsieur le Professeur D R E Y F U S

F A C U L T E D E M E D E C I N E D E P A R I S

Année 1966 T H E S E N°

pour le

D O C T O R A T en M E D E C I N E

Diplôme d'Etat

par

S A U G E R Françoise, Renée

née le 31 Mai 1938, à VERSAILLES

Attachée de Recherche à l' I . N . S . E . R . M .

Présentée et soutenue publiquement le

CONTRIBUTION A L'ETUDE d'UNE DESOXYRIBONUCLEASE de T Y P E I I

Président : Monsieur le Professeur D R E Y F U S

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

1/1/1966

PROFESSEURS HONORAIRES

MM.ALAJOUANINE (T.), AUBIN (A.), BENARD (H.), BINET (L.), BULLIARD (H.), CATHALA (J.), CHABROL (E.), CHAILLEY-BERT (P.) DEBRE (R.), FEY (B.), GALLIARD (H.), GAUDART d'ALLAINES (F.de GENNES (L. de), HALPHEN (E.), HAZARD (R.), HEUYER (G.), LAROCHE (G.), LAVIER (G.), LELONG (M.), LEVY-SOLAL (E.), LIAN (C.), MARCHAL (G.), MATHIEU (P.), MONOD (R.), MOREAU(R.) MOULONGUET (P.), PASTEUR VALLERY-RADOT, PETIT-DUTAILLIS (D.), PIEDELIEVRE (R.), QUENU (J.), RENARD (G.), RICHET (C.), SENEQUE (J.), STROHL (A.), TANON (L.), VERNE (J/).

DOYEN ..... Georges BROUET.

1er Assesseur.... Daniel BARGETON
2è Assesseur..... Jean GOSSET.

I.- PROFESSEURS

1° CHAIRES de SCIENCES FONDAMENTALES

a) Professeurs titulaires :	MM.
Anatomie.....	DELMAS (A.)
Anatomie et cytologie pathologiques..	DELARUE (J.)
Anesthésiologie.....	BAUMANN (J.)
Bactériologie et virologie.....	TOURNIER (P.)
BIOCHIMIE médicale.....	JAYLE (M.F.)
" "	POLONOVSKI (J.)
Biologie appliquée à l'Education physique et aux Sports.....	MALMEJAC (J.)
Biologie médicale.....	FAUVERT (R.)
Biophysique médicale.....	BUGNARD (L.)
" "	DOGNON (A.)
" "	DJOURNO (A.)
Cancérologie médicale et sociale.....	DENOIX (P.)
Chimie pathologique.....	SCHAPIRA (G.)
Embryologie.....	TUCHMANN (H.)
Génétique fondamentale.....	LEJEUNE (J.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie.....	COURY (Ch.)
Histologie.....	GIROUD (A.)
Hygiène et médecine préventive.....	BOYER (J.)
Médecine du Travail.....	DESOILLE (H.)

	MM.
Médecine légale.....	DEROBERT (L.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie).....	FASQUELLE (R.)
Parasitologie.....	BRUMPT (L.-C.)
Pathologie chirurgicale.....	LAURENCE (G.)
" "	KUSS (R.)
" "	VERNE (J.-M.)
Pathologie exotique.....	N...
Pathologie expérimentale et comparée.....	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale.....	LAROCHE(Cl.)
" "	BRICAIRE (H.)
" "	PEQUIGNOT (H.)
Pathologie respiratoire.....	TURIAF (J.)
Pathologie et thérapeutique générales.....	N...
Pharmacologie.....	CHEYMOL (J.)
"	LEVY (Melle J.)
Physiologie.....	BARGETON (D.)
"	PARROT (J.)
Physiologie et pathologie obstétricales..	LEPAGE (F.)
Radiologie médicale.....	DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale et chirurgie expérimentale.....	CAUCHOIX (J.)
Thérapeutique.....	CONTE (M.)
Thérapeutique appliquée.....	LAMOTTE (M.)

b) Professeurs à titre personnel :

Anatomie anthropologique.....	OLIVIER (G.)
Anatomie pathologique.....	NEZELOF (Ch.)
Bactériologie.....	BARBIER (P.)
Biochimie médicale.....	DESGREZ (P.) DREYFUS (J.-Cl.)
Biologie médicale.....	BOURLIERE (F.)
Histologie.....	COUJARD (R.)
Parasitologie.....	LARIVIERE (M.)
Pathologie expérimentale.....	LOEPER (J.) RICHET (G.)
Physiologie.....	DEJOURS (P. ROUCAYROL (J.-Cl.) SCHERRER (J.)
Physique médicale.....	KELLERSHOHN (L.) GOUGEROT (L.) TUBIANA (M.)
Radiologie médicale.....	FISCHGOLD (H.)

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546026_0020

2° CHAIRES DE SCIENCES CLINIQUES

a) Professeurs titulaires :	MM.
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker)	REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais)...	SOULIE (P.)
" " (Boucicault)..	LENEGRE (J.)
(Beaujon.....	LORTAT-JACOB (J.L)
("	N...
(Cochin.....	LEGER (L.)
(Hôtel-Dieu...	PATEL (J.)
Cliniques chirurgicales (St-Antoine...	GOSSET (J.)
(Salpétrière..	SICARD (A.)
(Tenon.....	OLIVIER (Cl.)
Clinique chirurgicale orthopédique et traumatologique (Cochin).	MERLE d'AUBIGNE R.
" " "	
" (Foch)	PADOVANI (P.)
Clinique de Chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades)...	FEVRE (M.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais.....	DUBOST (Ch.)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laennec).....	MATHEY (J.)
Clinique dermatologique (St-Louis)..	DUPERRAT (F.)
Clinique endocrinologique (Pitié)...	DECOURT (J.)
Clinique de Génétique médicale (Enfants-Malades).....	LAMY (M.)
Clinique gynécologique (Broca).....	HUGUIER (J.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (St-Louis).....	DEGOS (R.)
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades).....	TURPIN (R.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude Bernard).....	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Ste-Anne).....	DELAY (J.)
Cliniques des maladies métaboliques (Necker).....	HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais).....	BERNARD (J.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière)....	CASTAIGNE (P.)
(Bicêtre.....	DEPARIS (M.)
(Broussais.....	MILLIEZ (P.)
(COChin.....	BROUET (G.)
Cliniques (Hôtel-Dieu.....	BARIETY (M.)
médicales..... (Lariboisière....	SEZE (S. de)
(Pitié.....	DREYFUS (G.)
(St-Antoine.....	KOURILSKY (R.)
(St-Antoine.....	BOUDIN (G.)

	MM.
Clinique d'hydrologie et de climatologie (Bichat).....	DEBRAY (Ch.)
Clinique médicale infantile et pédiatrie sociale (Enfants-Malades)	MARIE (J.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais).....	JUSTIN-BESANÇON L.
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de la nutrition (Hôtel-Dieu).....	DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié)...	DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière)...	GARCIN (R.)
Cliniques obstétricales (Baudelocque.....	LACOMME (M.)
(St-Antoine.....	MERGER(R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal).....	VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu).	OFFRET (G.)
" " (Cochin)	BREGEAT (P.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière).....	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie.....	MOZZICONACCI -P.
Clinique de pédiatrie et de puériculture (St-Vincent de Paul)..	THIEFFRY (S.)
Clinique de pneumo-phtisiologie (Laennec).....	BERNARD (E.)
Clinique de neuro-psychiatrie infantile (Salpêtrière).....	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin).....	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Salpêtrière).	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard).....	ROUX (M.)
Clinique thérapeutique médicale (St-Antoine).....	LEMAIRE (A.)
Clinique toxicologique.....	GAULTIER (M.)
Clinique traumatologique et orthopédique (R.-Poincaré).....	JUDET (R.)
Clinique urologique (Cochin).....	ABOULKER (P.)
" " (Necker).....	COUVELAIRE (R.)
Hygiène et clinique de la 1ere enfance (Trousseau).....	LAPLANE (R.)
Séméiologie médicale (A. Chantin).....	DOMART (A.)
" " (Lariboisière)...	BOUVRAIN (Y.)
" " (Pitié).....	RAMBERT (P.)
" " (Rothschild).....	WOLFROMM (R.)
Séméiologie et clinique chirurgicale (Broussais).....	POILLEUX (F.)

b) Professeurs à titre personnel

	MM.
Hématologie	(ANDRE (R.) (BOUSSER (J.)
Hydrologie et climatologie	GIBERTON (A.)
Maladies infectieuses	BASTIN (R.)
Médecine	(AZERAD (E.) (bour (H.) (CABROL (Ch.) (CROSSMORD (A.) LAMBLING (A.) (LAUNAY (Cl.) (PAYET (M.) (PERRAULT (M.) (SIGUIER (F.) (WORMS (R.)
Neuro-chirurgie	LE BEAU (J.)
Neurologie	LHERMITTE (F.)
Neuro-psychiatrie	PICHOT (P.)
Oto-Rhino-Laryngologie	MADURO (R.)
Pédiatrie	(POLONOVSKI (Cl.) (ROYER (P.)
Pneumo-Phtisiologie	(KREIS (B.) (MEYER (A.)
Rhumatologie	DELBARRE (F.)

II.- PROFESSEURS sans CHAIRE

Anatomie Pathologique	GOUYGOU (Ch.)	Hématologie	BILSKI- PASQUIER
Anesthésiologie	VOJROH (G.)		
Bactériologie	CHRISTOL (D.)	Maladies infectieuses	DUPONT (J.)
Biochimie médicale	(Cartier (P.) (GONNARD (P.)	Physique médicale	(COURSAGET (J.) (GREMY (F.)
Biologie médicale	HARTMANN (J.)	Physiologie	GIRARD Fr.
		Stomatologie	CHAPUT (MmeA.
		Thérapeutique	CHASSAGNE (P.)

III.- PROFESSEURS DETACHES dans les UNIVERSITES PERIPHERIQUES

Bactériologie	HAUDUROY (P.) Pr.s.Ch.
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr.s.Ch.

IV.- PROFESSEUR ASSOCIE

	M.
Statistique médicale et épidémiologique..	SCHWARTZ (D.)

Secrétaire général de la Faculté....	M. LENA (J.)
Conseillers administratifs.....	(Melle CHAINTREUIL G. (M. FAYE (R.)
Conservateur en Chef de la Bibliothèque Conservateur du Musée d'Histoire de la Médecine.....	) M. le Dr. HAHN (A.)
Conservateurs.....	(Melles DUMAITRE (P.) (LAURENT (H.) (M. LENOIR (G.)
Bibliothécaires.....	(Mmes CONTET (J.) (FORGET (F.) (Melles DUROZOY (M-F) (ROBERGE (D.) (Dr. SCHILLER (J.)

A mes Parents,

A mes Grands-Parents.

- A Monsieur le Professeur J.C. DREYFUS,
Professeur de Biochimie à la Faculté de Médecine de PARIS

Il nous a fait l'honneur d'accepter la Présidence de cette thèse.

En témoignage de notre reconnaissance.

- A Monsieur le Professeur F. MATRAY,
Professeur de Biochimie à l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie de ROUEN.

- A Monsieur le Professeur René LAUMONIER,
Professeur d'Anatomie Pathologique à l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie de ROUEN.

- A Monsieur le Professeur G. BROUN,
Maître de Conférence, Agrégé de Biochimie à l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie de ROUEN.

- A Monsieur le Professeur R. LAQUERRIERE,
Maître de Conférence, Agrégé d'Anatomie Pathologique à l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie de ROUEN.

A nos Maîtres dans les Hopitaux :

- Monsieur le Professeur FLEURY,
Directeur de l'Ecole Nationale de Médecine et de Pharmacie de ROUEN,

- A Monsieur le Docteur J. BERTRAND

- A Monsieur le Docteur J.F. JOUANNOT,

- A Monsieur le Professeur G. LAURET,

- A Monsieur le Docteur P. VAUDOUR.

-:-

P L A N

-:-:-:-:-:-:-

INTRODUCTION

Chapître I

Rappel de la Structure des Acides désoxyribonucléiques

Rappel des principales propriétés des Acides désoxyribonucléiques,

Chapître II :

Les Enzymes Nucléolytiques,
Les Désoxyribonucléases,
Les Désoxyribonucléases de type II

Chapître III : TECHNIQUES

- Préparation du DNA,
- Extraction, purification partielle de la DNAse II de Foie de rat,
- Mesure de l'activité désoxyribonucléasique.

Chapître IV : RESULTATS

CONCLUSION

-:-

INTRODUCTION

I N T R O D U C T I O N

Le présent travail a été entrepris dans le cadre des activités de la Chaire de Biochimie (Professeur MATRAY) avec la collaboration du Laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'Ecole de Médecine de ROUEN (Directeur : Monsieur le Professeur LAUMONIER).

Il a eu pour point de départ des observations faites dans ce Laboratoire par Monsieur le Professeur Agrégé LAQUERRIERE. Cet Auteur, évaluant l'activité désoxyribonucléasique des coupes de foie de rat, par une technique personnelle originale, a constaté que cette activité désoxyribonucléasique était inhibée par le sérum humain. Cette inhibition est variable selon le sujet auquel a été pris le sérum : chez des sujets sains ou souffrant d'affections diverses, l'inhibition est relativement modérée, alors que si les sujets sont porteurs de tumeurs malignes, cette inhibition est extrêmement prononcée.

Aussi, avons nous entrepris l'étude biochimique du phénomène, dans l'espoir d'arriver à des résultats plus facilement mesurables, et peut-être, de pouvoir purifier l'inhibiteur en cause.

Notre thèse représente le travail préliminaire et relate l'isolement et la purification de l'enzyme, ainsi que l'étude de ses propriétés.

Le travail a bénéficié de l'aide de l'I.N.S.E.R.M. (Poste de stagiaire, puis d'attachée de recherche).

-:-

LES ACIDES DESOXYRIBONUCLEIQUES

Les acides nucléiques sont présents dans toutes les cellules animales et végétales. En tant que principaux constituants des chromosones, les acides désoxyribonucléiques sont les supports de l'hérédité. Par le rôle qu'ils jouent dans la synthèse des protéines, les acides ribonucléiques sont à l'origine de la synthèse de la matière vivante et de la croissance des organismes.

Les acides nucléiques sont formés de l'enchaînement d'unités plus simples ou nucléotides, comportant chacune, une base purique ou pyrimidique, un pentose et un groupement phosphoryle. Le pentose peut être, suivant le cas, le ribose (ARN) ou le désoxyribose (ADN).

La distinction entre acides ribonucléiques et acides désoxyribonucléiques tient principalement à la nature du pentose qui entre dans leur constitution et aussi, à la nature des bases.

Les acides ribonucléiques comportent les 4 bases, adénine, guanine, cytosine, uracile, alors que les acides désoxyribonucléiques renferment les 4 bases, adénine, guanine, cytosine, thymine.

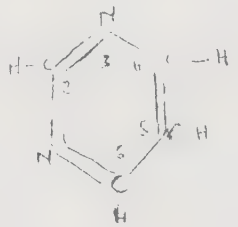
Dans la suite de cette thèse, seuls les acides désoxyribonucléiques nous intéressent, aussi ferons nous une étude détaillée de leur seule structure.

STRUCTURE des ACIDES DESOXYRIBONUCLEIQUES

I - Bases Puriques et Pyrimidiques

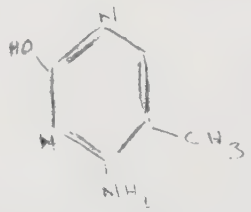
- Bases Pyrimidiques :

dérivent d'un noyau commun, la pyrimidine, que l'on numérote de la façon suivante :

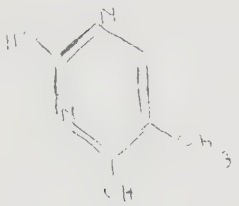


Les bases pyrimidiques que l'on rencontre dans l'ADN sont:

- la cytosine ou 2 hydroxy 6 amino pyrimidine,



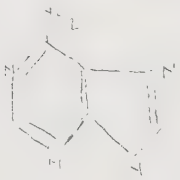
- la thymine ou 2 6 di hydroxy 5 méthyl pyrimidine,



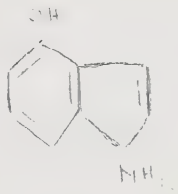
- Bases puriques :

Purine,

Adénine ou 6 amino purine,



Guanine ou 2 amino 6 hydroxypurine,



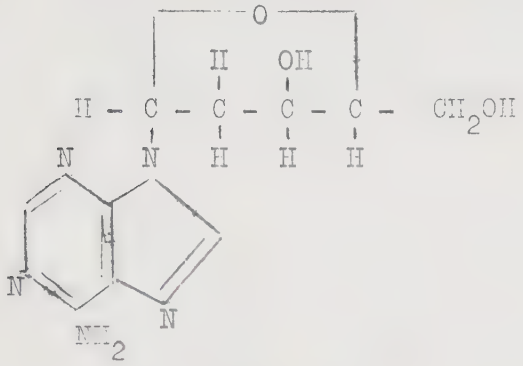
II - Nucléosides

Les nucléosides résultent de l'union d'une base pyrimidique ou purique avec un sucre qui est, soit le D ribofuranose, soit le D 2 désoxyribofuranose.

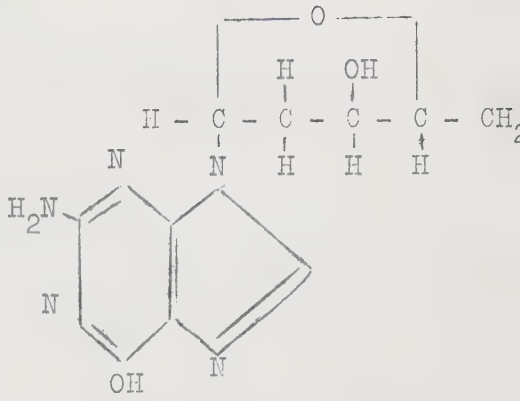
Les nucléosides seront les cas, des ribofuranosides ou des D 2 désoxyribofuranosides.

A partir des acides désoxyribonucléiques, on obtiendra les nucléosides suivants résultant de la combinai-

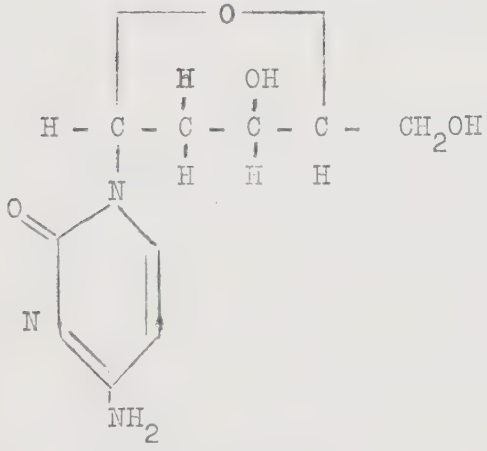
son du désoxyribose avec les quatre bases principales :
adénine, guanine, cytosine et thymine



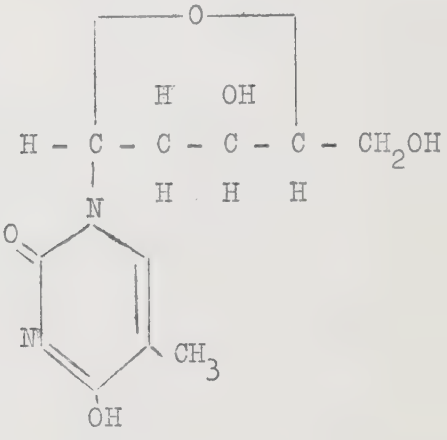
désoxy adénosine



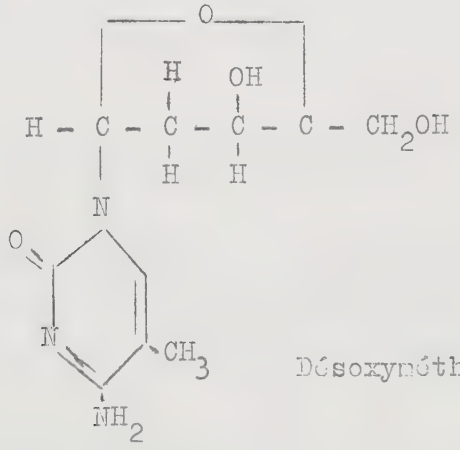
désoxy guanosine



désoxycytidine



thymidine



Désoxyméthyl cytidine

On considère habituellement que la liaison base-pentose a lieu entre
1 l'atome d'azote en position 3 des pyrimidines (ou en position 9 des purines) et le carbone c- 1' du pentose.

III - Nucléotides

Les nucléotides résultent de la phosphorylation des nucléosides. selon la position du groupement phosphoryle sur le sucre, on obtiendra

pour un même sucre, 2 nucléotides isomères différents ; dans le cas du désoxyribose, le groupement phosphoryle pourra se fixer en c 3' ou c 5'.

Les mono nucléotides isomères ont tous été obtenus, soit par des méthodes chimiques de synthèse, soit par hydrolyse enzymatique des acides nucléiques, soit encore trouvés à l'état libre dans la nature.

IV - Oligonucléotides

Cette dénomination peu précise est utilisée pour désigner l'enchaînement d'un petit nombre de mononucléotides. On parle d'oligonucléotides lorsque l'enchaînement considéré ne comporte pas plus d'une dizaine de mononucléotides.

V - Polynucléotides

On désigne par cette appellation, les enchaînements comportant plus de dix mononucléotides et pouvant aller jusqu'à des macromolécules de poids moléculaire supérieur à plusieurs millions.

VI - Acides désoxyribonucléiques

Ce sont des polynucléotides constitués par l'enchaînement d'un grand nombre de mononucléotides du type :

Base - désoxyribose - Acide phosphorique.

VII - Nucléoprotéines

On appelle nucléoprotéines les protéines conjuguées, résultant de la combinaison d'un acide nucléique et d'une protéine. Selon que l'acide nucléique est un ARN ou un ADN,

../...

on aura une ribonucléoprotéine ou une désoxyribonucléoprotéine.

Parmi les désoxyribonucléoprotéines, on peut distinguer :

- Les nucléohistones - la partie protéique est une histone. Elle est associée aux acides nucléiques de certains tissus glandulaires, comme le pancréas et le thymus.

- Nucléoprotamines : ces substances contiennent, en plus de la partie nucléique, une partie protéique ou protamine. Les protamines sont des polypeptides d'une masse moléculaire variant entre 2.000 et 5.000 et contenant une forte proportion d'arginine.
Leur répartition est très limitée : on ne les trouve que dans les cellules sexuelles des poissons.

- Désoxyribonucléoprotéines proprement dites.
Dans ces nucléoprotéines, l'ADN est lié par des liaisons de valence secondaire à une protéine n'ayant pas les propriétés basiques des protamines et des histones.

-:-

PROPRIETES DES ACIDES DESOXYRIBONUCLEIQUES

- Constitution en nucléotides et arrangement spatial de ceux-ci -

Les acides désoxyribonucléiques isolés de sources aussi diverses que thymus, spermatozoïdes, germes de blé, bactéries, bactériophages, se présentent toujours sous forme de masses blanches fibreuses. Ces fibres se dissolvent lentement dans l'eau distillée, en donnant une solution très visqueuse.

Selon HERKOVITS et Coll. (1961), on peut obtenir une dissolution partielle du DNA dans l'alcool, par dialyse de solution aqueuse de DNA contre des solutions aqueuses de plus en plus concentrées en alcool. D'autre part, lorsqu'il est sous forme de sel d'ammonium quaternaire, le DNA devient soluble dans un grand nombre de solvants organiques. Cette propriété, tout à fait remarquable, a été étudiée par AUBEL SADRON et Coll. (1960), qui ont démontré que, dans un premier temps, on pouvait précipiter les acides désoxyribonucléiques par un certain nombre de sels d'ammonium quaternaire, et dissoudre ensuite les nucléates d'ammonium quaternaire obtenus dans de nombreux solvants organiques polaires. Les sels de sodium des acides nucléiques peuvent ensuite être regénérés à partir des solutions organiques, par addition de chlorure de sodium.

Les teneurs relatives en différents nucléotides, exprimées généralement sous forme de bases puriques et pyrimidiques ou sous forme du rapport $\frac{A + T}{G + C}$, ont été

../...

étudiées par de nombreux auteurs, et grâce à des méthodes très précises (chromotographie sur papier des bases après hydrolyse acide des ADN, ou chromotographie sur échangeurs d'ions des nucléotides obtenus après hydrolyse enzymatique des ADN), une constance remarquable du rapport $\frac{A + T}{G + C}$ est observée tout le long de l'échelle animale.

La configuration spatiale des ADN a été étudiée par de nombreux auteurs et a suscité l'apparition de nombreuses théories. Le schéma proposé par WATSON et CRICK (1953) est désormais admis par tous les auteurs.

Cette structure comporte deux chaînes hélicoïdales enroulées autour du même axe. Elle suppose, selon les données chimiques couramment admises, la liaison 3' 5' phosphodiester. La nouveauté de cette structure réside dans la manière dont les deux chaînes sont maintenues ensemble par les bases puriques et pyrimidiques : les bases sont reliées entre elles par paires, une base de la première chaîne étant liée par une liaison hydrogène à une base de la deuxième chaîne.

Pour que la liaison ait lieu, la paire doit être constituée, d'un côté par une purine, de l'autre côté par une pyrimidine. Les liaisons hydrogène ont lieu de la manière suivante : purine position 1 à pyrimidine position 1, purine position 6 à pyrimidine position 6. Les paires seraient adénine (purine) couplée avec thymine (pyrimidine) d'une part, et guanine couplée avec cytosine d'autre part.

La conception del'appariement des bases est en complet accord avec les observations de plusieurs auteurs,

notamment CHARGAFF et son Ecole, observations selon lesquelles, le rapport des quantités d'adénine et de thymine serait voisin de 1, de même que le rapport guanine cytosine.

Les diagrammes de rayons X publiés depuis, sont compatibles avec cette théorie. Les implications génétiques de la théorie de WATSON et CRICK ont été discutées par les auteurs eux-mêmes ; la structure qu'ils ont proposée est compatible avec la possibilité de l'auto reproduction de la molécule.

Enfin WILKINS et Coll. (1961) ont obtenu des diagrammes de rayons X similaires aussi bien avec l'ADN isolé par des méthodes chimiques qu'avec l'ADN étudié sur certains matériels biologiques intacts, comme des têtes de spermatozoïdes ou des bactériophages.

- Détail de la structure des ADN, selon WATSON et CRICK -

(Sucre - Base ..... base - sucre)
Phosphate ( ) Phosphate
(Sucre - base ..... base - sucre)
Phosphate ( ) Phosphate
(Sucre - base ..... base - sucre)
( )

PROPRIETES SPECTRALES DES ACIDES NUCLEIQUES

Comme les monomères dont ils sont composés, les acides nucléiques absorbent la lumière U.V. L'absorption est maxima à 260 m , minima à 230 m . Le coéfficient d'extinction est environ 30 à 60 fois supérieur à ce-

lui des protéines. Le coéfficient augmente après la dégradation ou l'hydrolyse des acides nucléiques. En d'autres termes, la somme des coéfficients d'extinction des nucléotides qui composent l'acide nucléique, est supérieure à son coéfficient d'extinction propre.

Cet effet est appelé effet hyperchromatique. Il est dû à la diminution de résonnance dans les bases, lorsqu'elles son engagées dans la structure polynucléotique et à l'augmentation de la résonnance lorsque les bases sont libres.

POINT de FUSION

Le degré de résonnance des bases est encore plus diminué, lorsque l'ADN (ou l'ARN) se trouve à l'état d'une double chaîne. Cette double chaîne peut être rompue par divers agents : température, solution concentrée d'urée. On observe alors un effet hyperchromique. On appelle point de fusion d'un acide nucléique la température à laquelle cet effet hyperchromique apparaît brusquement. La dissociation des chaînes s'accompagne aussi d'une augmentation de la viscosité.

MASSE MOLECULAIRE

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour la détermination de la masse moléculaire des acides désoxyribonucléiques ; diffusion ultra centrifugation, diffusion de la lumière. Il semble que ce soit cette dernière méthode qui donne les meilleurs résultats, car elle a été la plus utilisée ces dernières années.

Même si l'on tient compte de l'imperfection des

../...

méthodes, on constate que les valeurs obtenues pour les masses moléculaires des ADN par différents laboratoires, montrent une cohésion tout à fait remarquable, bien supérieure à celle obtenue dans le cas des ARN. On obtient en gros deux groupes de valeurs : un premier groupe oscillant autour de 6×10^6, et un second groupe oscillant autour de 12×10^6.

SEPARATION des CHAINES

Si la replication se fait selon le schéma proposé, il faut que les chaînes se séparent. Elles ne pourraient se séparer que par déroulement, ce qui implique une rotation du DNA.

La nature des forces, impliquées dans ce déroulement, n'est pas connue, mais il est possible que les triphosphonucléotides précurseurs au moment de leur polymérisation fournissent l'énergie nécessaire.

DENATURATION

L'action de la châleur sur le DNA macromoléculaire en solution, aboutit à l'inactivation reversible de celui-ci par déroulement de la double hélice et passage du DNA du stade bicaténaire au stade monocaténaire. Le phénomène correspond à la "dénaturation" du DNA. En U.V., propriétés hydrodynamiques, apparence au microscope électronique, sont différents du DNA natif. Certains enzymes n'attaquent que l'ADN ainsi préparé.

ROWND et Coll. (1961) ont montré que par refroidissement lent, le processus de dénaturation peut être ren-

versé et le DNA renaturé. Au cours de la "renaturation", le DNA récupère sa structure hélicoïdale et son activité biologique.

Ces phénomènes de dédoublement et recombinaison du DNA à double hélice sont illustrés encore par des expériences sur la formation de DNA hybride à partir d'une chaîne dite lourde, comportant de l'azote ^{15}N et du deutérium, et une chaîne légère provenant de DNA normal. La formation d'1 hybride n'est possible que si les bases entrant dans la constitution des deux chaînes, artificiellement appairées, sont réparties dans des proportions analogues. Seuls les micro organismes, génétiquement voisins, possèdent donc un DNA susceptible de former un hybride in vitro par dénaturation thermique et recombinaison ultérieure

- : -

ENZYMES NUCLEOLYTIQUES

Avant d'aborder l'étude des désoxyribonucléases de type II, il nous a semblé utile de tracer un rapide tableau des enzymes nucléolytiques. Les acides nucléiques sont attaqués par de nombreux enzymes appartenant au groupe général des hydrolases, pour aboutir à la formation de fragments plus ou moins nombreux.

Ces enzymes sont dits "nucléolytiques".

Ils peuvent se subdiviser en quatre catégories principales. :

- 1) les nucléases catalysant le clivage des ponts entre les nucléosides sans libération de phosphore minéral.

- 2) Les nucléophosphatases (phosphomonoestérases) qui provoquent l'apparition de phosphore minéral libre par hydrolyse des groupements phosphoryles terminaux des nucléotides.

- 3) Les nucléosidases qui libèrent les bases libres en hydrolysant les liaisons base - pentose.

- 4) Les nucléodésaminases qui provoquent l'apparition d'ammoniaque libre à partir des bases puriques et pyrimidiques par désamination de ces dernières.

Seules les deux premières catégories ont des applications intéressantes en ce qui concerne la structure des acides nucléiques macromoléculaires.

../...

Les Nucléases

se subdivisent en deux grandes classes :

- Endonucléases
- Exonucléases.

A - Endonucléases

Ce sont des enzymes qui attaquent la chaîne nucléique par rupture de la liaison phosphodiester en des points multiples avec libération simultanée de nombreux fragments qui sont des mono et des oligo nucléotides.

Elles comportent :

- 1) des nucléases non spécifiques quant à la nature du pentose. Elles hydrolysent certaines fonctions phosphodiester sans distinction sur la nature du pentose.

C'est à dire que DNA, RNA polynucléotides divers sont hydrolysés avec formation d'oligo nucléotides qui peuvent être terminés soit par des groupements 3' phosphates, soit par des groupements 5' phosphates.

Si ces enzymes ne sont pas spécifiques quant à lanature du pentose, ils le sont quant à la nature des enchaînements puriques et pyrimidiques, car certaines liaisons sont préférentiellement rompues avec apparition d'oligonucléotides en plus des mononucléotides.

-2) des ribonucléases qui hydrolysent uniquement les polynucléotides de type ribonucléique avec formation de mono et oligo nucléotides.

../...

- 3) des désoxyribonucléases qui hydrolysent uniquement les polynucléotides de type désoxyribonucléiques, avec formation de mono et oligo nucléotides qui peuvent être terminés, soit par des groupements 3' phosphates, soit par des groupements 5' phosphates.

La nature des liaisons préférentiellement rompues est déterminée, comme pour les autres nucléases, par la séquence des bases puriques et pyrimidiques.

B - Exonucléases

Ce sont des enzymes qui attaquent la chaîne de façon récurrente (Step Wise Degradation), avec libération d'un seul mononucléotide à la fois. Elles sont constituées par les enzymes connus depuis longtemps sous le nom de phosphodiestérases qui hydrolysent les oligonucléotides jusqu'au stade de mononucléotides. Suivant le cas, les mononucléotides obtenus sont soit des 3' phosphates, soit des 5' phosphates.

Les phosphomonoestérases

se subdivisent en trois catégories :

A - Phosphomonoestérases non spécifiques qui hydrolysent tous les phosphomonoesters 3' phosphates ou 5' phosphates. Ces enzymes hydrolysent également tous les phosphomonoesters naturels ou synthétiques n'appartenant pas forcément au domaine des acides nucléiques.

B - 3' Nucléotidases hydrolysant uniquement les

nucléotides portant un groupement phosphoryle en position 3'.

c - 5' Nucléotides hydrolysant uniquement les nucléotides portant un groupement phosphoryle en position 5'.

-:-

DESOXYRIBONUCLEASES

A cette classification, nous ajouterons quelques notions plus précises sur les désoxyribonucléases, puisqu' elles sont l'objet de ce travail.

Des observations déjà anciennes (ARAKI 1903, ABDERHOLDEN et SCHITTENHELM, 1906, la BLANCHARDIERE, 1913, FEULGEN, 1935) avaient montré que des extraits de nombreux tissus et des sécrétions, comme le suc pancréatique, avaient la propriété de liquéfier les gels d'ADN sans libération de phosphate minéral ni de bases puriques et pyrimidiques, mais avec libération "d'Oligonucléotides". A l'heure actuelle, on sait que les désoxyribonucléases ou DNAses sont responsables de l'hydrolyse des ADN.

La première DNAse isolée fut la DNAse pancréatique. Elle fut isolée en 1950 par KUNITZ, qui notait dans son mémoire : "Cet enzyme dépolymérise l'ADN du thymus sans libération de phosphate minéral et il exige la présence d'ions divalents (Mg ++ Mn ++ Ca++) pour son activation". Cette DNAse n'a aucune action sur l'acide ribonucléique.

CUNINGHAM et LASKOWSKI (1953) ont suggéré de distinguer en gros deux types de DNAses, un premier type ou DNAse I , ayant un pH optimum d'activité aux environs de 7,0 et nécessitant des ions Mg ++ pour leur activation, et un second type ou DNAses II ayant leur pH optimum d'activité dans la région acide.

Les DESOXYRIBONUCLEASES de type II

L'objet de notre travail étant l'étude d'une DNAse de type II, il nous a paru intéressant de faire le point des connaissances acquises à ce sujet. Nous nous sommes aidés, pour ce faire, des études publiées par PRIVAT de GARILHE (1964) et LASKOWSKI.

Une DNAse possédant un optimum d'action dans une zone de pH allant de 4,5 à 5,5 et inhibée par l'addition de magnésium, fut observée par CATCHESIDE et HOLMES dès 1947 dans la rate, puis par MAYER et GRECO (1949) dans le thymus. Les observations furent bientôt confirmées et étendues aux autres tissus. Le nom de DNAse II, second type de DNAse animale, fut proposée pour cet enzyme. Plus tard, LASKOWSKI et Coll. (1953) proposèrent une méthode de purification plus poussée pour la DNAse II de thymus de veau, puis KOERNER et SINSHEINER (1957) étudièrent l'action d'une autre DNAse de type II isolée de la rate de veau.

METHODES de PREPARATION

Plusieurs méthodes ont été proposées pour la purification partielle de la DNAse II.

Quelques unes de ces méthodes sont examinées au Chapitre "Techniques".

CONDITIONS IONIQUES

Dans les premières publications, différentes valeurs

../...

ont été données pour le pH optimum allant de 4,2 à 5,5. On peut tenir compte de plusieurs éléments pour établir la valeur du pH optimum. Il ne semble pas que le pH optimum soit influencé par la nature du cation activateur (KOERNER et SINSHEINER - 1957) et par la concentration ionique du milieu, ni que ces variables soient interdépendantes. SHOAK (1959), ainsi que KURNICK et SANDEEN (1959) ont abouti à la même conclusion.

Les premières observations, selon lesquelles l'addition d'ions Mg ++ inhibait la DNAse II, alors que l'addition de citrate en augmentait l'activité, ont été également clarifiées.

L'exigence en ions Mg ++ est de l'ordre de 0,001 M et le substrat lui-même contient habituellement assez de Mg ++ pour satisfaire cette expérience. Des concentrations supérieures à 0,001 M sont inhibitrices. L'exigence en cations monovalents est de l'ordre de 0,2 à 0,3 M d'après SHIMOMURA et LASKOWSKI (1959) ainsi que KOERNER et SINSHEINER (1959). Les anions polyvalents, tels que l'ion sulfate, inhibent fortement à des concentrations aussi faibles que 0,005 M. Au point de vue de l'existence de variables interdépendantes influençant l'activité de la DNAse II purifiée, il n'estpas possible pour le moment de définir avec précision les conditions d'activité maximale. Après avoir comparé les conditions employées dans différents laboratoires, on pense (LASKOWSKI, Enzymes Vol. V) que les conditions suivantes approchent les conditions d'activité maximale - DNA 0,15 % - pH 4,5, tampon acétate de sodium 0,3 M.

../...

PRODUITS de la REACTION

KOERNER et SINSHEINER (1959) ont montré que la réaction se déroule en deux phases : la première phase, rapide, aboutit à un clivage d'environ 10% des liaisons internucléotidiques. Le point final de la deuxième phase, plus lente, est impossible à définir précisément, mais est voisin de la rupture de 25 à 30 % des liaisons. La distribution des fragments a été mise en évidence par chromotographie ; elle est tout à fait différente de celle résultant d'une hydrolyse par la DNAse I. La DN se II donne plus de mononucléotides, beaucoup moins de dinucléotides, et beaucoup plus d'oligonucléotides de haut poids moléculaire. Tous ces produits de réaction sont terminés en 3' phosphate. (KOERNER, SINSHEINER (1959), LAURILA, LASKOWSKI (1957), PRIVAT de GARILHE (1964) -

Une controverse existe, concernant l'influence des bases adjacentes sur la sensibilité des liaisons internucléotidiques, vis à vis de la DNAse II. KOERNER et SINSHEINER (1959) ont analysé les fragments après hydrolyse par la DNAse II, en observant les terminaisons et ont trouvé les quatre nucléosides et tous les nucléotides diphosphates. Ils conclurent que la DNAse II ne montre pas de préférence pour les bases puriques ou pyrimidiques adjacentes à la liaison sensible. Dans une étude indépendante, quelques dinucléotides et un trinucléotide furent isolés de la DNAse II et une analyse séquentielle fut pratiquée.-(LAURILA, LASKOWSKI, 1957) - La séquence pyrimidine purine ne fut pas retrouvée et la conclusion fut que cette liaison était préférentiellement rompue par la DNAse II. Comme dansle cas de la DNAse I, la préférence ne peut être exprimée en termes quantitatifs.

../...

INCIDENCES

Il y a un degré considérable d'incertitude, quant au fait de savoir si les enzymes reconnus dans les différents tissus, comme DNAse II, sont le même enzyme. De semblables difficultés ont été rencontrées dans la discussion de la distribution de la DNAse I. La similitude évidente des DNAses II, extraites d'organes lymphatiques (rate et thymus) est très forte et basée sur :

- les méthodes identiques de purification,
- la formation de produits terminaux en 3' phosphate,
- les exigences identiques en ions.

Ces conclusions ont été rapportées par OTH, FREDERICQ et HACHA (1958) pour la DNAse II de thymus, par KOERNER et SINSHEINER, pour celle de rate.

INHIBITEURS

On a parlé à plusieurs reprises d'un inhibiteur tissulaire de la DNAse II (KOSZALKA, SCHREIER, ALTMAN - 1954), en disant que l'augmentation de l'activité de la DNAse II observée après l'irradiation par les rayons X d'un animal était due à la destruction de l'inhibiteur. Cependant, la nature chimique de l'inhibiteur n'a pas été mise en évidence.

DISTRIBUTION INTRACELLULAIRE

Elle a été étudiée dans le thymus (BROWN, JACOBS,

LASKOWSKI - 1952), et dans le foie (SCHNEIDER et HOGEBOOM - 1952) - (SHACK - 1957) et dansun certain nombre d'autres tissus (ALLFREY et MIRSKY - 1952). Dans tous les tissus étudiés, la localisation de l'enzyme ne coïncide pas avec celle du DNA. Normalement, la DNAse II est associée aux mitochondries qui contiennent aussi de la DNAse I. On trouve très peu de DNAse II dans le noyau. Dans le thymus (BROWN, JACOBS et LASKOWSKI - 1952), et selon ALLFREY et MIRSKY, dans la rate et le foie, les noyaux contiennent environ 20 % de la DNAse II de la cellule.

- : -

T E C H N I Q U E S

TECHNIQUES

Le travail comporte la description des techniques que nous avons utilisées, à savoir :

- 1°) la préparation d'acide désoxyribonucléique du thymus de veau. Cette préparation par la méthode décrite par KAY, SIMMONS et DOUNCE est désormais classique et donne des résultats satisfaisants. Nous n'en avons pas essayé d'autre.

- 2°) Préparations d'extrait enzymatique de DNAse II de foie de rat.

- 3°) Mesure de l'activité désoxyribonucléique de nos préparations.

En ce qui concerne ces deux dernières techniques, nous avons exposé, dans ce travail, les quelques méthodes mises à notre disposition, et les résultats qu'elles nous ont donnés..

Préparation de l'ACIDE DESOXYRIBONUCLEIQUE de THYMUS de VEAU

Les méthodes de préparation des ADN peuvent se décomposer en trois phases :

- dans la première phase, on agite rapidement le tissu broyé pour faire passer en solution saline diluée le maximum d'impuretés dont le RNA soluble, en particulier dans Nacl 9 °/oo, tandis que l'ADN demeure insoluble sous forme de "fils de chromatine".

- dans la deuxième phase, on fait passer l'ADN en solution tandis qu'une deuxième fraction d'impuretés est éliminée, cette fois, par centrifugation.

- enfin, dans la troisième phase, on précipite l'ADN de sa solution par addition d'alcool éthylique. La mise en solution de l'ADN a lieu, soit par une agitation prolongée en solution saline, selon la méthode déjà ancienne de HAMMARSTEN (1924), soit en présence d'agents tensio actifs, selon la méthode de KAY, SIMMONS et DOUNCE (1952).

C'est cette méthode (KAY, SIMMONS, DOUNCE) que nous avons utilisée. Cette technique, déjà éprouvée, donne d'excellents résultats.

PRINCIPE

On traite le thymus de veau par un détergent, le

le lauryl sulfate de Na, qui sert à la fois d'agent d'extraction et de défécant. Le détergent, en effet, dissocie l'acide nucléique des protéines et semble efficacement bloquer l'action autolytique enzymatique qui pouvait particllement dépolymériser l'acide nucléique.

Après le premier traitement, l'acide brut obtenu, mis en solution dans du chlorure de sodium N, est purifié par plusieurs précipitations successives dans l'éthanol.

Pour obtenir une meilleure déprotéinisation, on peut faire un deuxième traitement par le détergent.

Enfin, une centrifugation finale dans ClNa 0,9 °/oo permet d'éliminer les traces de produits insolubles restantes. Avec du thymus de veau, on obtient 80 à 90 % de l'acide total contenu dans le thymus. Compte tenu des purifications successives, on peut admettre que l'extraction est quantitative.

REACTIFS

1°) - Lauryl sulfate Na 5% dans éthanol 45 %
Lauryl sulfate Na pur de "SINNOVA" 5 g
Ethanol 45 % q.s.p. 100 ml

2°) - Ethanol 45 %

3°) - Ethanol 95 %

4°) - Nacl RP

5°) - Acétone RP

6°) - Nacl solution 0,9 °/oo contenant du Citrate Na 0,01 M.

.../...

METHODE

- 1°) On prélève le thymus de veau le plus rapidement possible, après le sacrifice de l'animal. Pour obtenir un acide ayant un bon degré de polymérisation, du matériau très frais doit être utilisé. On transporte le thymus dans de la glace (0°). On congèle alors le thymus et si on ne l'utilise pas immédiatement après congélation, on peut le conserver à - 15 ° pendant une semaine environ. Il semble que, pour une raison encore inconnue, la congélation soit indispensable, car si l'on opère sur le tissu non congelé, on obtient un produit partiellement dépolymérisé.

- 2°) Prendre 50g de thymus congelé, couper rapidement en morceaux, puis homogénéiser dans un "Waring Blendor" à la vitesse maxima pendant 3 minutes, en présence de 200 ml de NaCl 0,9 % contenant du citrate de Na 0,01 M et refroidi préalablement à 0°. L'homogénat est ensuite centrifugé à 0°, à environ 2.500 tours/ minute, pendant 30 minutes. On jette la suspension surnageante, et on traite le culot de centrifugation 3 fois de suite, comme le thymus du début (homogénéisation du culot dans le "Waring Blendor" avec du NaCl citraté, centrifugation, élimination du surnageant, reprise du culot, etc...). Le culot final consiste essentiellement en fils de chromatine contaminés d'un peu de fibre.

- 3°) Le culot est ensuite homogénéisé dans le "Waring Blendor" pendant 3 minutes avec 1.000 ml de NaCl 0,9 % à 0°, et la suspension obtenue est placée dans un grand beicher ou un ballon à fond plat. On agite violemment (si possible avec un agitateur mécanique) et on ajoute

.../...

lentement et doucement 90 ml de solution de stock de lauryl sulfate Na à 5 % dans l'éthanol 45 %. Au cours de l'addition, le mélange se transforme en gel assez ferme. On agite ce gel pendant 3 heures à la température ordinaire. Au cours de cette agitation, le gel se transforme en solution sirupeuse très visqueuse. La concentration finale de lauryl sulfate dans un mélange est de 0,41 %.

- 4°) Après cette phase d'agitation, on ajoute 55 g de NaCl de façon à amener la concentration en NaCl à 1 M. On agite encore 5 à 10 minutes pour que le NaCl se dissolve complètement. L'addition de NaCl diminue considérablement la viscosité.

- 5°) On centrifuge le tout à 2.500 tours / minute, pendant 3 heures à 0°.

- 6°) Le liquide surnageant opalescent est décanté du culot protéique. On ajoute ensuite à ce liquide visqueux, un volume égal d'alcool à 95 % tout en agitant. Un précipité très gélatineux apparait, qui se déshydrate peu à peu, et se transforme en une masse blanche fibreuse : on peut l'enrouler autour d'un agitateur. On exprime le surnageant restant dans la masse et on transfère le précipité dans un autre beicher.

- 7°) Le précipité est lavé trois fois avec de l'éthanol 95 %, puis avec de l'acétone, jusqu'à ce que l'acétone surnageante ne soit plus trouble. Le produit ainsi lavé est séché à l'air.

- 8°) Le désoxyribonucléate de Na brut ainsi obtenu, est dissous dans 700 ml H20 distillée à la température ordinaire ; cette opération nécessite environ 2 heures d'agita-

tion vigoureuse avec un fort agitateur. Quand le produit est complètement dissous, on ajoute 63 ml de la solution à 5 % de lauryl sulfate. On agite encore une heure. Puis on ajoute de nouveau 45 g de NaCl R.P. pour rendre molaire la concentration en NaCl. On agite encore 5 à 10 minutes, jusqu'à dissolution totale du NaCl. Puis on centrifuge dans une Servall à vitesse maxima (13.000 tours / minute) pendant au moins une heure. On recueille le liquide surnageant et on précipite à nouveau le désoxyribonucléate de Na (Na - DNA) en ajoutant au surnageant un volume d'éthanol 95 % comme précédemment. Le précipité de Na - DNA est lavé à l'alcool, puis à l'acétone, comme précédemment, puis séché à l'air.

- 9°) Le produit ainsi obtenu est dissous dans 700ml H20 distillée, à la température ordinaire (voir opération 8), ce qui nécessite, comme précédemment, une heure d'agitation rapide et continue ; 6,3 g de NaCl sont ajoutés, de sorte que la concentration en NaCl soit de 0,9 % : ceci provoque la précipitation des moindres traces de protéine restantes, tout en entrainant une petite partie de Na-DNA. La solution est alors centrifugée à la température ordinaire pendant une heure à 13.000 tours/ minute dans une Servall. On recueille le surnageant.

- 10°) On ajoute au surnageant précédent, 35 g de NaCl, de façon à amener la concentration en NaCl à 1 M. On précipite le Na-DNA en ajoutant un volume d'éthanol 95 %, tout en agitant. Le précipité est lavé avec C2H5OH et CH3COCH3, jusqu'à ce que l'acétone surnageante soit limpide (voir opération 7). Le produit ainsi très purifié est séché à l'air.

Partant de 240 g de thymus frais, nous avons obtenu 11 g 58 de DNA sec. Le produit désséché a une structure très fibreuse.

Une solution de ce DNA à 1 g/ litre dans du tampon acétate de Na 0,1 M pH 5, présente une viscosité relative, par rapport à l'eau distillée égale à 3. (mesurée au viscosimètre d'Ostwald).

Cette préparation est intitulée DNA natif.

Nous avons également préparé une solution de DNA dénaturé par la châleur, sous forme de solution à 0,5 mg/ ml, dans H2O distillée. Cette solution est mise pendant 30 minutes au bain marie 100 °, puis refroidie dans de l'eau glacée.

Cette solution mère de DNA à 0,5 mg/ml dans H2O distillée sert de base pour faire des substrats à des concentrations différentes de DNA ou de tampon.

-:-

PREPARATION de la DESOXYRIBONUCLEASE II

de FOIE de RAT

Nous nous sommes inspirés, pour procéder à l'extraction de DNAse II de foie de rat, des techniques publiées par :

- LASKOWKI et Coll (1954)
- FREDERICQ et OTH (1958)
- ROBERT et SINSHEINER (1959)
- HODDES et SWENSON (1962).

Tous ces auteurs utilisent des précipitations successives alcooliques et salines suivies de chromatographie sur colonne, pour obtenir un haut degré de purification.

L'objet initial de notre travail n'étant pas l'isolement d'une préparation hautement purifiée de DNAse II, nous nous sommes contentés de la première partie de la purification qui nous permettait d'obtenir des préparations dont l'activité enzymatique était suffisante et qui étaient à peu près complètement dépourvues d'activité phosphatasique.

PURIFICATION PARTIELLE de la DNAse II de thymus
(selon LASKOWSKI et Coll.- 1954).

Du thymus de veau frais est coupé en morceaux et broyé au "Waring Blendor" et laissé pendant la nuit dans 1 litre de NaCl 0,14 glacé, contenant du Cl 2 Ca 0,02 M, après que le pH du mélange ait été ajusté à 5.

Le mélange est filtré à travers plusieurs épaisseurs de gaze. Le liquide trouble est mélangé avec 250 g de Célite n° 545 et est de nouveau filtré à travers une couche de Célite n° 512, (300 g) sur Büchner à travers un papier Whatmann n° 1. L'enzyme est précipité du filtrat clair, entre 30 et 90 % de saturation SO4(NH4)2.

PREPARATION d'une DNAse II de RATE de VEAU
(HODDES et SWENSON - 1962).

Les rates de veau sont prélevées peu après le sacrifice de l'animal et congelées. Le tissu est degelé avant l'extraction, puis homogénéisé dans 200 ml de tampon acétate 0,2 M (pH 4,5) Na 2 SO4 0,05 M. L'homogénat repose une nuit à 4° C, puis est centrifugé à 40.000 g pendant 15 minutes dans une centrifugeuse refroidie Servall.

Le surnageant est chauffé au bain marie à 60 °, pendant une heure et dialysé deux fois pendant 18 Heures contre 2 litres de tampon phosphate 0,005 M pH 6 à 4 °. La solution est ensuite de nouveau centrifugée à 40.000 g.

-:-

Personnellement, nous avons utilisé deux sortes de préparations enzymatiques pour lesquelles nous nous sommes inspirées des techniques ci-dessus décrites.

- 1°) Une préparation d'enzyme brute.

Des foies de rat sont broyés au broyeur Virtis (40.000 tours/minute) pendant 2 minutes, dans trois fois

leur poids de NaCl 0,14 M et CaCl 2 0,02 M amené à pH 5. La préparation est laissée au repos une nuit à 4° C, puis centrifugée à 25.000 g environ pendant 20 minutes.

Le surnageant obtenu est un liquide trouble, laissé au repos 24 heures à + 4° C, puis centrifugé de nouveau à 20.000 g. On obtient ainsi un liquide rougeâtre qui est conservé à - 20° C. Après une quinzaine de jours, la préparation est dégelée, puis centrifugée. Toutes les protéines colorées (hémoglobines) sont précipitées. On obtient un liquide jaune pâle.

- 2°) Préparation enzymatique purifiée.

Les foies de rats sont broyés au broyeur Virtis (40.000 tours/minute pendant 2 minutes) dans trois fois leur poids d'une solution de NaCl 0,14 M et CaCl2 0,02 M amené à pH 5. Le broyat est laissé au repos pendant 18 Heures à 4° C, puis centrifugé dans une centrifugeuse Servall à vitesse maximum pendant 1 heure (37.800 g).

Le surnageant est chauffé pendant 35 minutes au bain marie à 60 °, puis centrifugé dans la centrifugeuse Servall pendant 50 minutes à vitesse maximum. Le surnageant est ensuite mis à dialyse contre 10 litres de tampon PO4H2Na 0,005 M pH 6.

Après trois jours de dialyse, on obtient un liquide sombre centrifugé une heure à 34.800 g (Servall). Cette préparation est ensuite soumise à des précipitations successives par des concentrations croissantes de SO4(NH4)2. On obtient, ainsi,une série de 5 fractions : la première pré-

précipitant à 55 % de saturation, les suivantes à 65, 75, 85 et 95 % de saturation.

L'essentiel de l'activité enzymatique se trouve dans les trois dernières fractions.

Comme pour la préparation brute, une conservation pendant 15 jours à - 20 ° C élimine les protéines colorées.

- : -

MESURE de l'ACTIVITE

de la DESOXYRIBONUCLEASE

Pour mesurer l'activité DNAsique de nos préparations, nous disposions de nombreuses méthodes, parmi lesquelles nous avons étudié celles qui suivent :

I - METHODE VISCOSIMETRIQUE

Cette méthode sensible et rapide a été décrite par LASKOWSKI et SEIDEL. Elle avait été auparavant mise au point par GREENSTEIN (1942).

Expérimentalement, on opère de la manière suivante : 5 millilitres de la solution d'ADN 0,1 mg/ml préparé selon la méthode de KAY, SIMMONS et DOUNCE, dans le tampon borate 0,2 M à pH 7,0 sont placés dans un viscosimètre d'Ostwald immergé dans un bain marie à 37 °. L'extrait enzymatique à étudier est dilué dans le même tampon, jusqu'à une concentration convenable, et chauffé à la même température. Au moment du dosage, on ajoute rapidement dans le viscosimètre 3 microlitres de l'enzyme dilué.

On agite vigoureusement et on mesure la viscosité au temps 0. Dans les trente minutes qui suivent, on fait des mesures de viscosité à des intervalles de 5 minutes.

II - METHODE SPECTROPHOTOMETRIQUE

KUNITZ (1950) ayant observé que l'action de la DNAse

sur une solution d'ADN s'accompagnait d'une augmentation de la densité optique à 260 mμ , atteignant un maximum de 30 % pour une dépolymérisation à peu près complète, propose d'utiliser le phénomène comme méthode de dosage de la DNAse. En effet, de même que pour la RNAse, la variation de densité optique est proportionnelle à la concentration en enzyme, du moins dans la première partie de la réaction. Le substrat est constitué par 2 millilitres d'une solution aqueuse d'ADN à 2 mg/ml, plus 10 ml de sulfate de magnésium 0,05 M, plus 10 m ml de tampon acétate M pH 5, le tout additionné d'eau pour un volume final de 100 ml.

A 3 ml de ce substrat, on ajoute 1 ml d'eau. Ceci constituera le blanc.

A une autre quantité de 3 ml de substrat, on ajoute 1 ml de la solution enzymatique.

La densité optique à 260 mμ est lue toutes les 30 secondes à 1 minute pendant 15 minutes, de préférence dans un système thermostatique à 37 °. Pendant un délai qui va de 2 à 10 minutes, selon la concentration de l'enzyme, la courbe est linéaire.

Bien entendu, cette méthode n'est applicable que dans la mesure où la solution à doser ne renferme pas trop de substances absorbant à 260 mμ autre que le DNA. D'autre part, depuis que l'on sait que l'augmentation de la densité optique dépend de la rupture des liaisons hydrogène unissant la purine d'une chaîne de DNA à la pyrimidine de la chaîne complémentaire (REICHMAN M.E. - 1956), il est évident que le DNA natif seul peut être employé comme substrat.

.../...

III - METHODE utilisant le CHANGEMENT d'AFFINITE pour les COLORANTS (vert de méthyle)

Dans une série d'expériences commencées en 1946, KURNICK avait démontré que l'affinité du DNA pour le vert de méthyle dépendait de la structure native du DNA. Des changements dans la configuration de la molécule de DNA par des moyens chimiques, physiques ou enzymatiques entraînaient une affinité moindre pour le vert de méthyle.

KURNICK et FORSTER ont montré que le complexe vert de méthyl - DNA a un spectre d'absorption de la lumière visible, différent de celui du vert de méthyl libre, et que la couleur de ce complexe est stable à pH 7,5, tandis que celui du vert de méthyl libre diminue jusqu'à la décoloration, avec la formation du carbinol.

Pour l'étude de la DNAse acide, le substrat est constitué par 100 ml d'une solution aqueuse à 2 mg/ml de vert de méthyl + 200 ml de tampon acétate 0,05 N pH 4,6 (ou autre, si nécessaire) + 100 ml de Cl 2 Mg 0,6 N + 700 ml d'eau distillée + 1 ml d'une solution aqueuse à 1 % d'éthyl mercurithio salicylate de sodium. A 12 ml de ce substrat à 37 ° C, on ajoute 1 ml d'enzyme.

A des intervalles de temps égaux, 2 ml du mélange sont pipetés et ajoutés à 2 ml d'un mélange d'une part de citrate de sodium 0,33 M et 3 parts de tampon tris pH 7,5. Ce mélange stoppe la réaction, en ajustant le pH à 7,5, pH auquel la DNA acide n'est pas active. Après une nuit à l'obscurité, la densité optique est lue à 640 m .

La présence de particules en suspension ne gène pas la

réaction, cependant, elles peuvent être éliminées par centrifugation, si elles ne se dissolvent pas pendant l'expérience.

Cette méthode est simple et permet l'essai simultané de plusieurs échantillons.

IV - METHODES UTILISANT LE DOSAGE DE NUCLEOTIDES SOLUBLES

Il s'agit de nucléotides produits sous l'action de la DNAse, notamment les nucléotides solubles en présence de sels de lanthane, d'acide trichloracétique ou d'acide perchlorique.

On sait que les acides nucléiques hautement polymérisés peuvent être aisément précipités sous forme de sels de lanthane (DAVIDSON et WAYMOUTH - 1944). On peut donc utiliser ce phénomène et suivre l'apparition des nucléotides solubles en présence de sels de lanthane sous l'action de la DNAse. Les détails expérimentaux de cette méthode ont été fournis par BOMAN et KALETTA (1957).

LASKOWSKI (1946) a mis au point une méthode comparable, mettant en jeu le dosage du "phosphore soluble" en présence d'acide trichloracétique à 10 %.

ADAMS (1963) reprend une méthode décrite par DE DUVE PRESSMAN, GIANETTO et Coll. (1955). Le substrat est une solution contenant 6 mg de DNA/ml de saccharose 0,25 M ajustée à pH 5 avec du tampon acétate 0,2 M et contenant du Cl 2 Mg 0,002 M. Le substrat est dialysé pendant 24 Heures contre une solution semblable de saccharose pour éliminer les impuretés de bas poids moléculaire. Une portion (0,25 ml) du substrat est mise à incuber pendant 0 à 15 minutes avec la solution

enzymatique. La réaction est stoppée par addition d'un volume égal d'acide perchlorique 10 % glacé. Les tubes sont centrifugés 10 minutes puis l'absorption du surnageant est mesurée à 260 mμ. L'activité de l'enzyme est exprimée en môles de thymidine libérée durant l'incubation de 15 minutes.

- -

Nous avons donc essayé plusieurs de ces méthodes.

Tout d'abord, la méthode viscosimétrique.

Mais du fait que nous opérons à un pH acide (pH = 5), les protéines en solution coprécipitent avec le DNA, formant des aggrégats qui bouchent le viscosimètre. CEt inconvénient nous a obligé à renoncer à cette méthode.

Nous avons également utilisé la méthode spectrophotométrique. Elle nous a paru d'une sensibilité satisfaisante, mais, nous l'avons vu, elle n'intéresse que la séparation des chaînes de DNA qui suit la rupture des liaisons hydrogène et, de ce fait, ne permet pas de suivre une hydrolyse prolongée.

Par ailleurs, nous avons vu qu'elle s'adressait à des préparations très pures (telles que la DNAse cristallisée de KUNITZ) ne renfermant pas trop de substances susceptibles d'absorber la lumière à 260 mμ .

Enfin, nous avons tenté d'utiliser le changement d'affinité pour le vert de méthyle, mais nous n'avons pas obtenu de résultats satisfaisants par cette méthode dont la sensibilité n'était pas suffisante pour nos préparations.

../...

- Nous avons finalement utilisé pour tous nos essais, une méthode utilisant le dosage des nucléotides acido solubles, inspirée de celle de DE DUVE, PRESSMAN, GIANETTO, et dont le principe est le suivant :

On mesure la quantité de nucléotides acido solubles apparus dans la solution. L'acide utilisé pour la précipitation est l'acide perchlorique 5 %. Les nucléotides sont évalués par la mesure de la densité optique à 260 mμ .

7,5 ml de substrat auxquels sont ajoutés 0,5 ml d'enzyme sont maintenus dans un bain marie à 37 °. On suit l'hydrolyse pendant une heure et demie, en faisant un prélèvement toutes les 30 minutes de 0' à 90'. On prélève 1,5 ml du mélange substrat enzyme que l'on met immédiatement en contact avec un volume équivalent d'acide perchlorique 10 % dans un bain de glace, et on agite. Les tubes ainsi prélevés sont mis au repos pendant 10 minutes, puis centrifugés ensuite pendant 10 minutes, dans une centrifugeuse refroidie International à 20.000 g environ. On mesure l'absorption du liquide surnageant à 260 mμ au spectrophotomètre BECKMANN D.U. En ajoutant ainsi à 7,5 ml de substrat, un certain volume de solution enzymatique, on peut évaluer l'activité d'une solution.

Pour mesurer une activité inhibitrice, on utilise une quantité de préparation enzymatique, telle que l'augmentation de densité optique sans inhibition soit de l'ordre de 1 à 2 unités optiques.

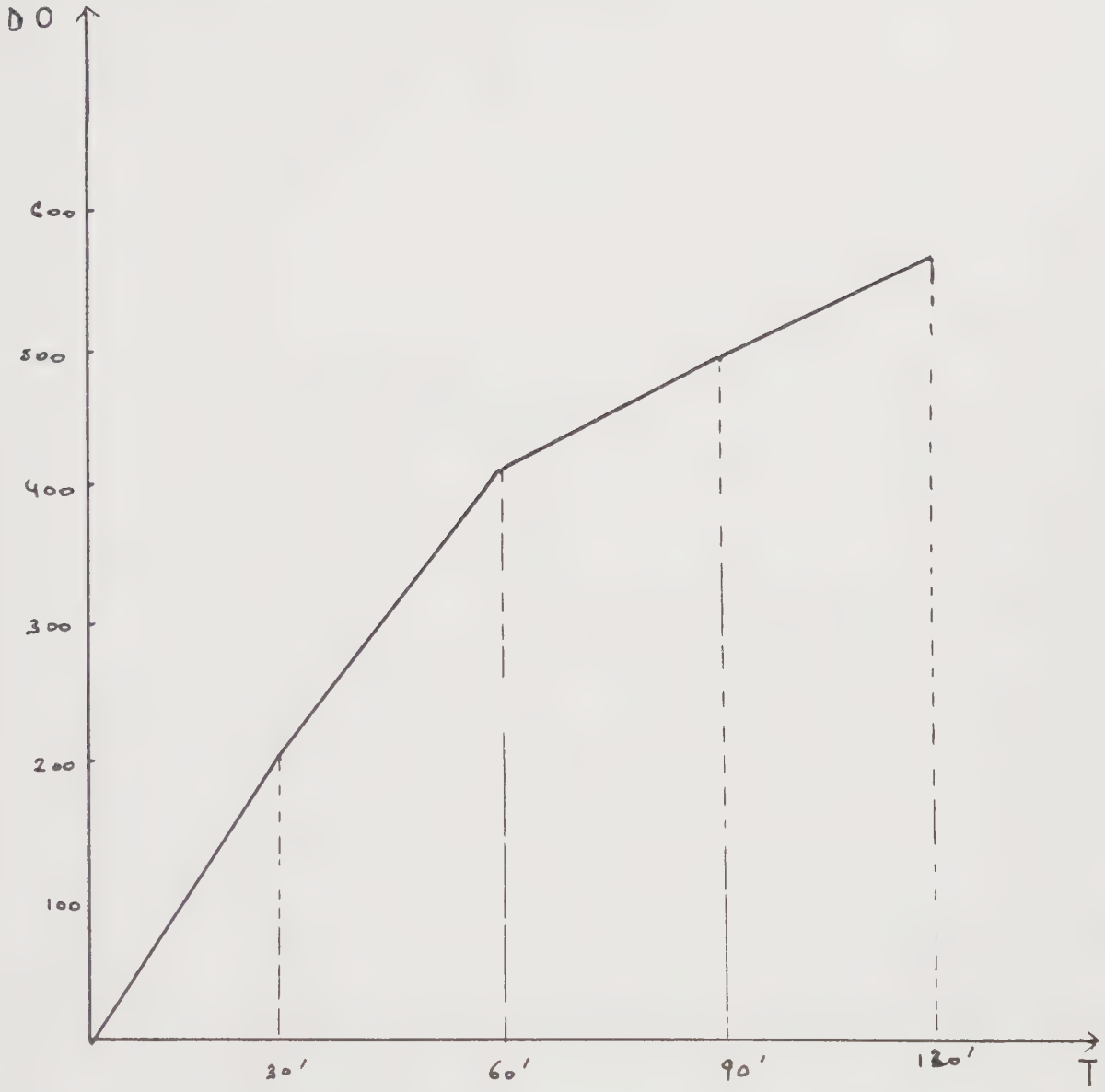
En l'absence de sérum, la courbe représentant l'hydrolyse en fonction du temps est sensiblement linéaire jus-

qu'à 1 H.30. Au delà de 1 H.30, avec les concentrations couramment utilisées dans nos expériences, la courbe s'incurve et tend vers un plateau.

Nous avons utilisé cette technique tout au long de l'étude des propriétés de nos préparations enzymatiques.

Toutes les courbes étudiées donnent en ordonnée, l'absorption à 260 mμ mesurée au spectrophotomètre BECKMANN D.U., et en abscisse, le temps.

-:-



Hydrolyse du DNA par la DNAse II de foie de rat

RESULTATS

R E S U L T A T S

Afin de comparer nos préparations de DNAse II aux autres préparations analogues déjà étudiées, nous avons vérifié un certain nombre de leurs propriétés. Les DNAses de ce type, les plus étudiées, ont été celles du thymus et de la rate de veau signalées dès 1949 par MAVER et GRECO dans des préparations de cathrepsine obtenues à partir de ces organes. L'aspect le plus remarquable des propriétés enzymatiques de ces préparations de DNAse est le fait que leur pH optimum d'activité se situe dans la région acide et l'influence particulière des cations divalents agissant comme activateurs aux faibles concentrations et comme inhibiteurs aux fortes concentrations.

Nous avons donc étudié en premier lieu l'influence du pH et des cations divalents sur nos préparations.

Nous avons également étudié l'influence des concentrations en enzyme, l'influence de la concentration en DNA du substrat, puis l'influence de la force ionique du tampon.

Dans cette étude, nous avons toujours opéré en tampon acétate, comme il a été fait pour les autres DNAses II.

I - Influence du pH

L'influence du pH a été étudiée dans une zone de pH allant de pH 4,5 à pH 5,5.

Le pH optimum d'action pour nos préparations est de 5.

Essai	pH	D O 260 m				≠ 60'
		0'	20'	40'	60'	
1	5	16	139	280	435	419
2	5,3	15	93,5	185	323	308

II - Influence de la force ionique

L'activité des préparations varie avec la force ionique. L'optimum d'action correspond à des concentrations de tampon, allant de 0,01 M à 0,2 M et 0,3, les résultats étant sensiblement comparables à ces trois concentrations.

L'activité est diminuée de moitié pour une concentration du tampon égale à 0,4 ou 0,5 M, ou pour des concentrations inférieures à 0,05 M.

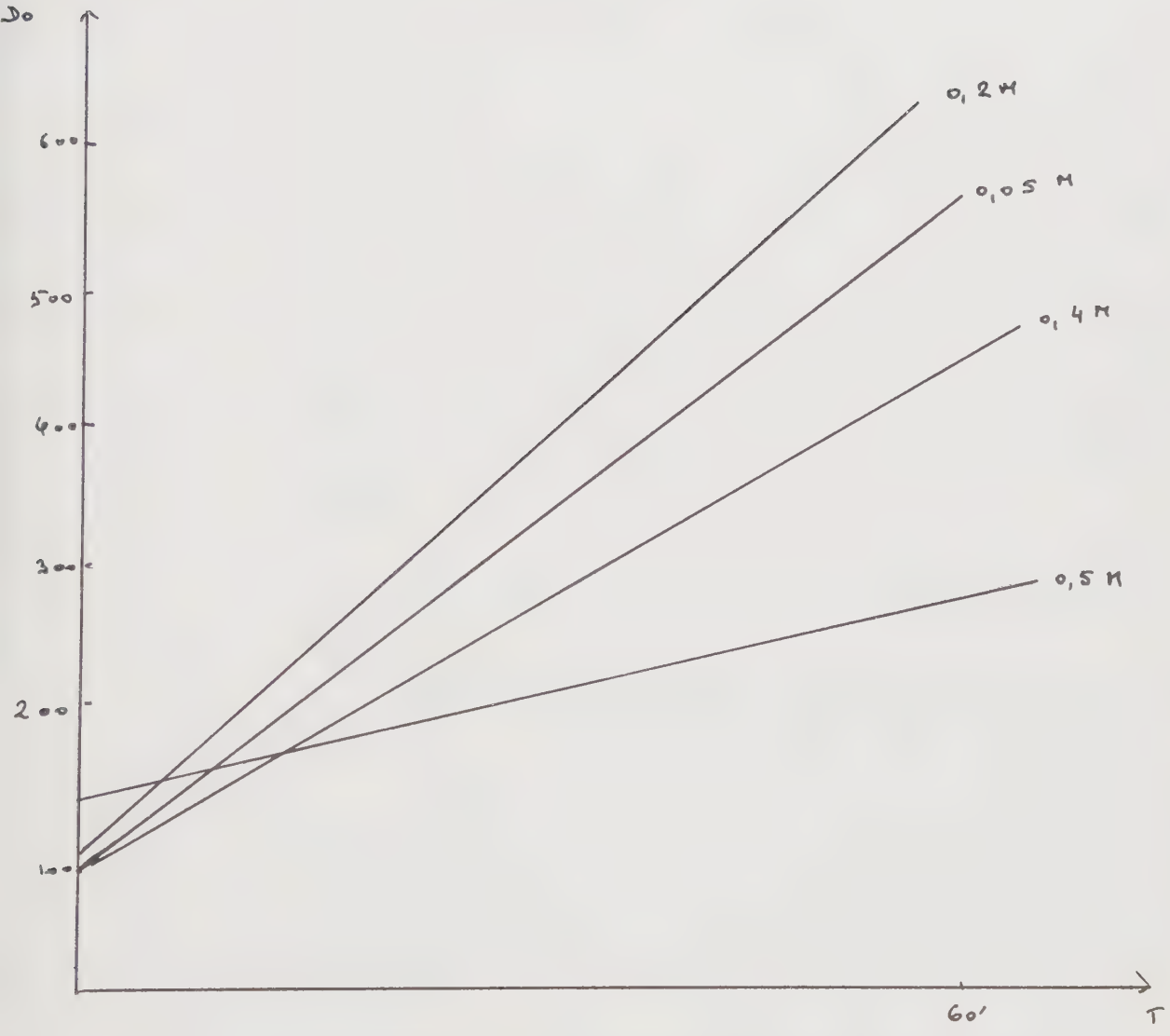
Elle est pratiquement nulle lorsque la concentration du tampon atteint et dépasse 0,6 M.

Les observations sont en accord avec ce qui a été dit des DNAses II déjà étudiées. (LASKOWSKI, The Enzymes, Vol. V).

Le tableau suivant montre l'influence de la force ionique du substrat sur l'activité de la DNAse II de foie de rat.

Essai	Force ionique du substrat	D.O. 260m			≠ 1 H.
		0'	30'	60'	
1	0,05 M	85	320	540	455
2	0,1 M	120	335	600	480
3	0,2 M	100	330	640	540
4	0,3 M	85	300	590	505
5	0,4 M	85	235	415	330
6	0,5 M	140	155	230	90

../...



Influcence de la concentration ionique du substrat

III - INFLUENCE de CERTAINS CATIONS DIVALENTS Ca++ Mg++

Sur nos préparations de DNAse II de foie, les cations divalents agissent comme activateurs aux faibles concentrations et comme inhibiteurs aux fortes concentrations. Le phénomène est normal pour une DNAse II. En effet OTH et Coll. (1958) avaient noté que pour une concentration en ions Mg++ allant de 0,002 à 0,0025 M, l'activation était de 100%. Cependant la concentration optima en cations divalents est nettement plus élevée pour la DNAse II de foie que pour les autres DNAses, puisqu'elle est de 0,015 M, valeur pour laquelle l'activité est augmentée d'environ 80 % par rapport à un témoin ne contenant pas de cations divalents. Etant donné ce phénomène, nous opérons en l'absence de citrate et en présence de Ca ++ et Mg ++ à la concentration de 0,0075M chacun.

Ces résultats sont concrétisés dans les tableaux suivants :

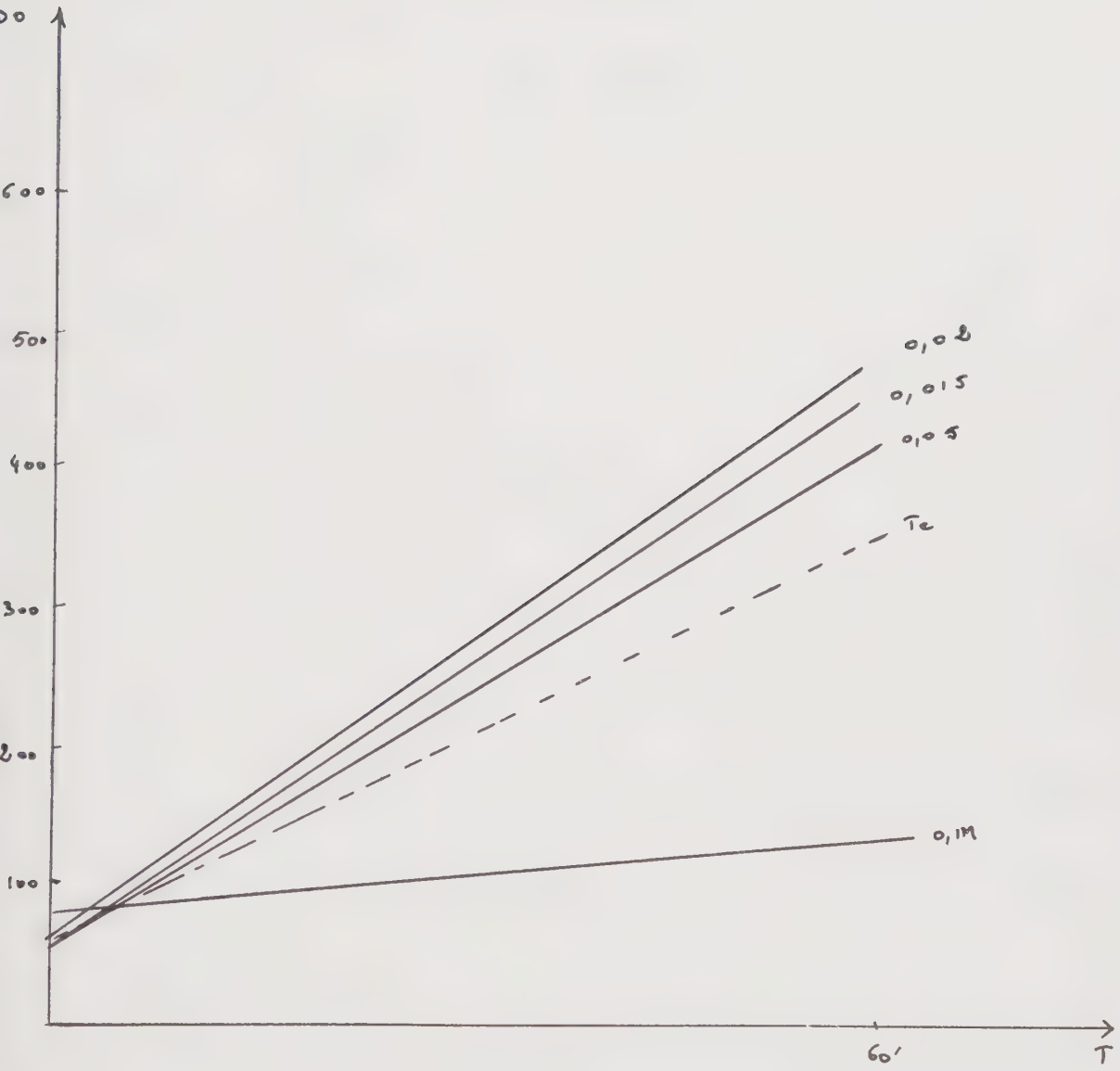
- 1°) Influence de la concentration en ions Ca++ sur l'activité de la DNAse II de foie de rat

Substrat : DNA 0,1 Mg/ml dans acétate Na 0,2 M pH 5 9ml, auxquels on ajoute 1 ml de solution de Cl 2 Ca à des concentrations croissantes, allant de 0,01 M à 0,5 M. Les concentrations finales du substrat en Ca++ vont de 0,001 M à 0,05 M.

Hydrolyse selon technique habituelle. Lecture Densité optique BECKMANN D.U après précipitation perchlorique et centrifugation.

../...

Essais	Ca++	DO 260m 0'	DO 260m 60'	≠
Témoin	0	48	307	259
1	0,001 M	65	340	275
2	0,0025	72	382	310
3	0,0050	76	395	319
4	0,0075	80	425	345
5	0,01	73	440	367
6	0,015	70	487	417
7	0,02	52	461	409
8	0,03	47	420	373
9	0,04	51	375	324
10	0,05	52	267	215
11	0,1	53	64	11



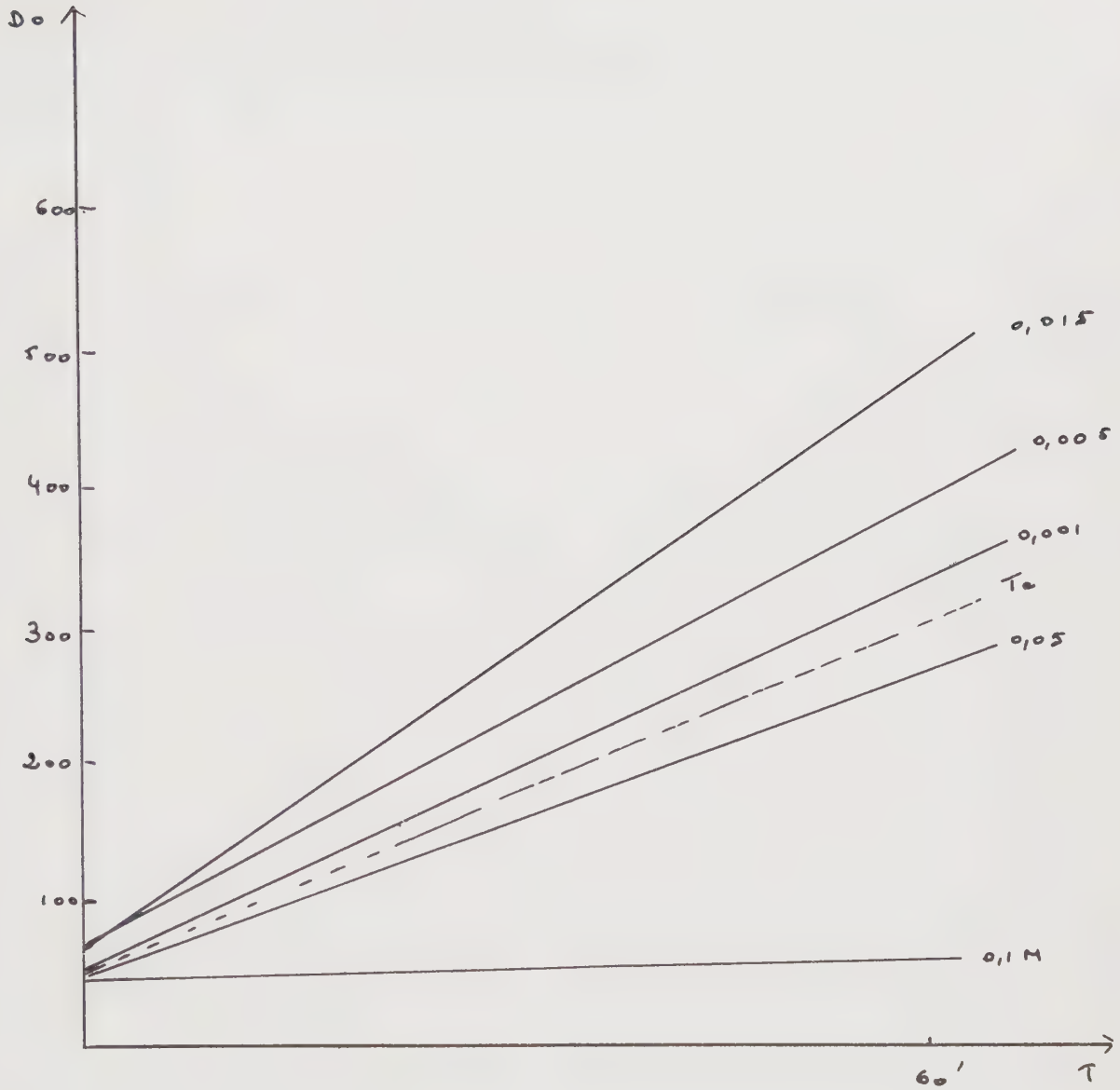
Influence de la concentration en ions Ca^{++} du substrat

- 2°) Influence de la concentration en ions Mg ++ sur l'activité de la DNAse II de foie de rat

Même technique que pour l'étude de l'influence des ions Ca ++, la solution Cl 2 Ca étant remplacée par une solution Cl 2 Mg.

Essais	Mg++	D O 260m 0'	D O 260m 60'	≠
Témoin	0	62	357	295
1	0,005	64	422	358
2	0,01	65	465	480
3	0,015	62	469	407
4	0,02	61	490	429
6	0,1	78	137	59

Ces deux tableaux mettent en évidence l'activation de la DNAse II par les cations divalents pour des concentrations en Ca++ ou Mg ++ allant de 0,015 M à 0,02M avec des concentrations optima de 0,01 à 0,02 M, puis une inhibition nette pour une concentration de 0,1 M.



Influence de la concentration en ions Mg^{++} du substrat

Nous effectuons alors une hydrolyse avec un substrat contenant les deux cations Ca++ et Mg ++ à la concentration de 0,0075 chacun.

Nous obtenons le résultat suivant :

D 0 0'	D 0 60'	Différence
74	528	454

- les deux cations ne sont pas antagonistes.- Ils agissent de façon synergique.

../...

IV - ANIONS INHIBITEURS

La DNAse II de foie est inhibée par l'ion sulfate et le fluorure. Le même phénomène a été observé avec les autres DNAses II.

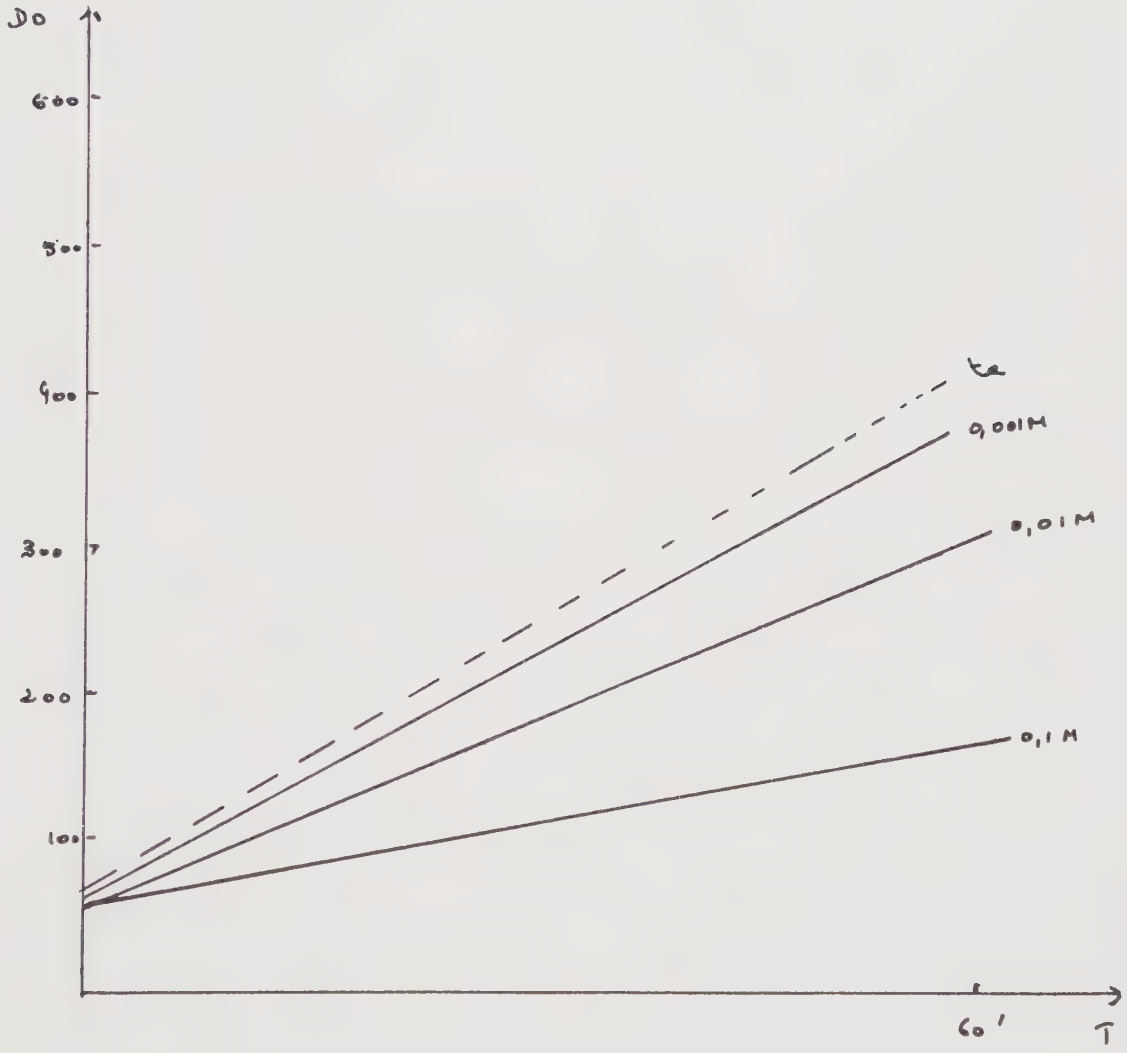
L'étude de l'hydrolyse, menée selon la technique habituelle, en présence de fluorure de sodium, nous a donné les résultats suivants :

Essai	Concentration en Ions F	Densité optique 260m		Δ
		0'	60'	
Témoin	0	50	390	340
1	0,001 M	66	362	296
2	0,01 M	56	287	231
3	0,1 M	67	167	100

L'inhibition est faible pour une concentration en ions F.,

elle nette à 0,01 M,

très importante pour une concentration égale à 0,1 M.



Influence de la concentration en fluor du substrat

V - INFLUENCE de la CONCENTRATION en DNA du SUBSTRAT

Le substrat que nous employons habituellement contient 0,1 mg/ml de DNA. A cette concentration ou à concentration inférieure (0,05 mg/ml), l'hydrolyse par la DNAse suivie par la densité optique à 260 m du surnageant après précipitation perchlorique, donne une courbe sensiblement linéaire pendant une heure et demie. Cette courbe atteint alors un plateau. Si l'on augmente la concentration du substrat en DNA, la courbe d'hydrolyse, pour une même concentration d'enzyme, prend une allure un peu différente. La libération des nucléotides perchloro solubles est plus lente, plus prolongée et plus importante au bout de 4 heures.

Ces résultats sont concrétisés par le tableau suivant.

Essai	Concentration du Substrat en DNA mg/ml	D O 260 m								
		0'	30'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'
1	0,05	40	245	420	500	570	600			
2	0,1	71	177	400	600	750	960	1050	1050	1050
3	0,2	118	170	310	500	700	920	1100	1300	1350
4	0,3	122	155	250	415	590	770	990	1250	1300

VI - INFLUENCE de l'ETAT du DNA

La préparation enzymatique est deux fois moins active sur le DNA dénaturé que sur le DNA natif. Lors de nos fractionnements par $SO_4(NH_4)_2$, le rapport des activités $\frac{\text{DNA natif}}{\text{DNA dénaturé}}$ est à peu près constant pour les différentes fractions. Ce qui tend à éliminer l'hypothèse que nous avions envisagée à un moment, que ces deux activités exercées par des enzymes différents.

Ceci est en accord avec les données publiées par BERNARDI et SADRON (1963).

VIII - PURIFICATION de l'ENZYME

La technique indiquée précédemment nous a permis, pour une quantité de protéines donnée, d'obtenir une préparation 80 à 100 fois plus riche en activité DNAsique que l'extrait brut de départ. Nous avons en effet pratiqué des dosages de protéines sur une série de 4 fractions obtenues par des précipitations successives par des concentrations croissantes de SO4(NH4)2, la première précipitant à 50 % de saturation, les suivantes à 60 %, 70 % et 80 %.

Nous appelons E la préparation avant précipitation par SO4(NH4)2, P 50, P 60, P 70, P 80 les fractions précipitées par SO4(NH4)2.

Echantillon	Taux Protéines en g/l
E	55,6
P 50	3,70
P 60	1,96
P 70	0,98
P 80	0,45

Or, nous avons obtenu avec les préparations E, et P 80, des courbes d'hydrolyse comparables.

D'autre part, les préparations purifiées, P 70, P 80, que nous avons utilisées, contenaient 250 fois moins de phosphatase acide que l'extrait brut.

Echantillon	Phosphate acide	dont Tartrate labile
E	230 U	78
P 60	22,5	0
P 70	2,5	0
P 80	0,96	0

Nos préparations d'enzymes partiellement purifiées, présentent les mêmes propriétés que les préparations d'enzymes brutes; des expériences vis à vis du pH, des cations activateurs, des anions inhibiteurs, donnent les mêmes résultats.

Cependant ces préparations montrent une indifférence beaucoup plus grande vis à vis de la concentration ionique du tampon, ainsi que le montre le tableau suivant :

Essai n°	Force ionique du tampon	D O 260 m			Δ
		0'	30'	60'	
1	0,05 M	77	180	340	263
2	0,1	31	210	385	354
3	0,2	24	200	380	356
4	0,3	20	225	395	385
5	0,4	20	150	295	257
6	0,5	30	170	325	295

- o -

../...

C O N C L U S I O N

C O N C L U S I O N

Au cours de ce travail, nous avons donc procédé à une extraction, puis à une purification partielle d'une désoxyribonucléase de foie de rat. Pour ce faire, nous avons utilisé les techniques proposées dans la littérature et, en particulier, celles décrites par LASKOWSKI, HODDES et SWENSON (1962).

L'examen des propriétés de cette préparation enzymatique nous a amenés aux conclusions suivantes :

- pH optimum 5,
- concentration ionique optima du substrat 0,2 M, tampon acétate de sodium
- concentration du substrat en cations divalents Ca ++ et Mg ++ 0,015 M, (soit 0,0075 pour chacun de ces éléments)
- Anion inhibiteur Fluor.

On peut dire que les propriétés de la DNAse II de foie de rat sont comparables à celles des autres DNAses de ce type déjà décrites.

Il est cependant à noter que la concentration optima en cations divalents Ca ++ et Mg ++ est nettement plus élevée que pour les autres DNAses, puisque pour une concentration en cations divalents atteignant 0,015 M, l'activité est augmentée environ de 80 %, par rapport à un témoin ne contenant pas de cations divalents.

Le point de départ de notre travail était l'étude biochimique d'une réaction histochimique mise au point par le Professeur LAQUERRIERE.

Nous sommes parvenus au terme de cette comparaison à la conclusion que les deux enzymes considérés étaient différents, ceci pour les raisons suivantes :

- la réaction histochimique est de siège presque exclusivement nucléaire, alors que la DNAse II est localisée en grande partie dans la fraction lyzosomale de la cellule.

- Notre enzyme parait actif sur du DNA hautement polymérisé, alors que la réaction histochimique est réalisée en présence d'un substrat comportant du DNA partiellement dégradé.

- Notre enzyme parait facilement soluble, puisque l'extraction en est aisée et, s'il comporte une copule nucléique, il ne semble pas lié de façon solide aux nucléoprotéines, alors que des tentatives ultérieures d'isolement d'une fraction enzymatique histochimiquement active, nous ont donné un produit étroitement lié à des nucléoprotéines.

- Enfin en ce qui concerne l'inhibition par la fraction globulinique de sérums humains provenant de sujets cancéreux , objet primitif de notre travail, nous n'avons pu mettre en évidence de différence significative entre les sérums de sujets normaux et les sérums de sujets cancéreux.

- BIBLIOGRAPHIE -

1.- ABDERHALDEN (E.) et SCHITTENHELM (A.) — 1906 - Z.Physiol.Chem. 47 -452.

2.- ADAMS — 1963 - Biochem. Journal 87 p.532

3.- ALLFREY et MIRSKY J. — Gen. Physiol. 36 - 227 1952.

4.- ARAKI (T.) — 1903 - Z. Physiol.Chem. 38 - 84

5.- AUBEL, SADRON et Coll. — 1960 - B.B.A. 42 - 542

6.- AUBEL, SADRON et Coll. — 1961 - B.B.A. 53 - 11

7.- BERNARDI et SADRON — 1964 - Biochemistry - 3 - 1411

8.- BERNARDI et GRIFFE — 1964 - Biochemistry - 3 - 1419

9.- BOMAN (H.-G.) et KALETTA (U.) — 1957 - B.B.A. - 24 - 621

10.- BROWN, JACOBS et LASKOWSKI — 1952 - J.B.C. 194 - 445

11.- CATCHESIDE et HOLMES — 1947 - Symposia Soc. Exptl. Biol. N° 1 - 225

12.- CHARGAFF et DAVIDSON — - The Nucleie Acids - Vol I

13.- CUNNINGHAM et LASKOWSKI — 1953 - B.B.A. 11 - 590

14.- DAVIDSON et WAYMOUTH — 1944 - Biochem. Journal - 38-379

15.- DE DUVE, PRESSMANN, GIANETTO et Coll. — 1955 - Biochem. Journal -60 -604

16.- FEULGEN (R.) — 1935 - Z. Physiol. Chem. 237-261

17.- FREDERICQ E. et OTH A. — 1958 - B.B.A. - 29 - 281

18.- GREENSTEIN — 1942 - F.P. 1 - 113

19.- HAMMARSTEN (E.) — 1924 - Biochem. Z - 144 - 383

20.- HERSKOVITS (T.) SINGER (S.V.) GEIDUSCHEK (E.P.) — 1961 - Ach. Biochem.Biophys.

../...

21.- HODDES (N.E.) et SWENSON Mary K — 1962 - B.B.A. 61 - 612

22.- KAY, SIMMONS, DOUNCE — 1952 - J.Am.Chem.Soc. - 74-1724

23.- KOERNER et SINSHEIMER — 1957 - J.B.C. 228 -P. 1039 et 1049

24.- KOSZALKA, SCHREIER, ALTMAN — 1954 - B.B.A. - 15 - 194

25.- KURNICK et FORSTER — 1950 - J. Gen.Physiol. -34 - 147

26.- KURNICK et MIRSKY — 1950 - J. Gen. Physiol.-33 - 265

27.- KURNICK et SANDEEN — 1950 - B.B.A.-39/227 -33

28.- KUNITZ — 1950 - J. Gen.Physiol. 33 - 363

29.- LA BLANCHARDIERE — 1913 - Z. Physiol.Chem. 87 - 291

30.- LASKOWSKI (M.) — 1946 - Arch. Biochem.Biophys. 11 - 41

31.- LASKOWSKI (M.) — 1961 - The Enzymes - Vol.5 Chap. 8

32.- LASKOWSKI et SEIDEL — 1945 - Arch. Biochem. Biogph. 7 465

33.- LASKOWSKI, STEBERL, AKKA, WATSON — 1954 - B.B.A. 13 - 595

34.- LAURILA, LASKOWSKI — 1957 - J. Biochem. 228 - 49

35.- MAVER et GRECO — 1949 - J.B.C. 181 - 853, 861

36.- MAVER et GRECO — 1954 - F.P. - 13 - 261

37.- MAVER et GRECO — 1956 - J. Natl. Cancer Institute 17 - 503 -

38.- OTH, FREDERICQ et HACHA — 1958 - B.B.A. - 29 - 287

39.- PRIVAT de GARILHE — 1964 - Les Nucléases

40.- PRIVAT de GARILHE — 1961 - Path, Biol.Sem. Hop PARIS - 9 129

../...

41.- PRIVAT de GARILHE et LASKOWSKI — 1954 - B.B.A. - 14 - 147

42.- REICHMANN (M.E.) — 1956 - J. Phys. Chem. 60- 831

43.- ROWND, LANYI, DOTY — 1961 - B.B.A. - 53 - 225

44.- SCHNEIDER et HOGEBOOM — 1952 - J.B.C. 198 - 155

45.- SHACK (J.) — 1957 - J.B.C. - 226 - 573

46.- SHIMOMURA et LASKOWSKI — 1957 - B.B.A. - 26 - 198

47.- SINSHEIMER (R.) — 1954 - J. Biol.Chem. - 208 - 445

48.- WATSON et CRICKS — 1953 - Nature - 171 - 737

49.- WATSON et CRICKS — 1953 - Nature - 171 - 964

50.- WILKINS — 1961 - J. Chim. Phys. - 58 - 891

-:-:-:-:-:-

Vu le Doyen,

Pour le Doyen

l'Assesseur

Vu et permis d'imprimer

Le Recteur

de l'Académie de PARIS.

Vu le Président du Jury,